

紫外 - LiCl 联合 ARTP 诱变选育高产花生四烯酸的高山被孢霉突变株

张鑫, 凤元邦, 冯雪, 张春枝, 陈明

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要:为得到遗传性状稳定、高产花生四烯酸(ARA)的高山被孢霉菌株,以实验室保藏的高山被孢霉 FD-1 为出发菌株,采用紫外 - LiCl 联合常压室温等离子体(ARTP)技术进行诱变处理,并进行 TTC 平板初筛和摇瓶发酵复筛。结果表明,经紫外 - LiCl 联合 ARTP 诱变处理,获得一株高产 ARA 的高山被孢霉突变株 Z6 - A23。菌株 Z6 - A23 所产油脂中 ARA 含量高达 44.57%, ARA 产量达 3.62 g/L, 分别较出发菌株 FD-1 提高了 75.40% 和 223.21%。经 10 次传代培养,突变株 Z6 - A23 代谢合成 ARA 性能稳定,说明其具有良好的遗传稳定性。综上,突变株 Z6 - A23 有望成为高产 ARA 的潜力菌株。

关键词:花生四烯酸;高山被孢霉;诱变育种;紫外 - LiCl;ARTP

中图分类号:TQ92;TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2025)04-0082-07

Breeding of *Mortierella alpina* mutants with high yield of arachidonic acid by UV - LiCl combined with ARTP mutagenesis

ZHANG Xin, FENG Yuanbang, FENG Xue, ZHANG Chunzhi, CHEN Ming

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: In order to obtain a genetically stable and high yield arachidonic acid (ARA) - producing *Mortierella alpina* strain, mutagenesis of the strain of *M. alpina* FD-1 preserved in laboratory was performed by UV - LiCl combined with atmospheric and room temperature plasma (ARTP) method, and the strain was screened by TTC plate and the fermentation in shaking flasks. The results showed that a mutant strain Z6 - A23 with high yield of ARA was obtained by UV - LiCl combined with ARTP mutagenesis. The ARA content in the oil produced by the mutant strain Z6 - A23 reached as high as 44.57%, and the ARA yield was 3.62 g/L, which were 75.40% and 223.21% higher than those of the original strain FD-1, respectively. After 10 subcultures, the mutant Z6 - A23 had stable ability to synthesize ARA, indicating that it had good genetic stability. In conclusion, the mutant strain Z6 - A23 obtained is expected to be a promising strain for efficient ARA production.

Key words: arachidonic acid; *Mortierella alpina*; mutagenesis breeding; UV - LiCl; ARTP

花生四烯酸(ARA, C20:4)属于 ω -6 多不饱和脂肪酸,是合成前列腺素、血栓素、白三烯等激素样调节分子的重要前体^[1]。ARA 在增强免疫、心血管

健康、抗炎、神经系统发育等方面发挥重要作用,对胎儿及婴幼儿脑发育至关重要^[2]。因此,ARA 常被用于保健品、药品和婴幼儿配方奶粉。人体内 ARA 可通过亚油酸转化合成,但效率有限,须通过饮食获得^[3]。肉类和鸡蛋等是人体 ARA 的主要来源,但由于其中的 ARA 含量较低,不能用于规模生产^[4]。深海鱼油是工业化生产多不饱和脂肪酸的主要原料,但因 ARA 含量低以及全球鱼类资源日益减少,不适用于大规模生产 ARA^[5]。随着生物工程技术的发

收稿日期:2024-01-16;修回日期:2024-11-27

基金项目:辽宁省自然科学基金(2024-MS-171)

作者简介:张鑫(1998),女,硕士研究生,研究方向为微生物发酵(E-mail)z199210022021@163.com。

通信作者:陈明,教授(E-mail)chenming@dlpu.edu.cn。

展,微生物发酵生产ARA越来越受到人们的关注,且该方法存在原料来源稳定、价格低廉等优势^[6],已成为ARA生产的主要方法。

被孢霉属、耳霉属等微生物能够合成ARA^[7]。高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、轮梗霉(*Diasporangium* sp.)是发酵生产ARA的研究热点。如:Goyzueta - Mamani等^[8]利用高山被孢霉发酵生产ARA,所得油脂中ARA含量为35%;杨勇等^[9]利用深黄被孢霉发酵生产ARA,ARA产量达3.12 g/L;戴群等^[10]通过轮梗霉发酵获得ARA,其产量为0.257 g/L。迄今为止,高山被孢霉被认为是生物合成ARA最有潜力的微生物,其生产的富含ARA油脂已获得美国食品药品监督管理局的安全认证^[11]。

为获得高产ARA的高山被孢菌株,物理、化学诱变育种是常用方法^[12]。这些方法包括使用 γ 射线、紫外线、离子束、微波、常压室温等离子体(ARTP)、氯化锂(LiCl)、2-脱氧-D-葡萄糖、硫酸二乙酯(DES)等引发碱基突变或DNA损伤来诱发菌株突变^[13]。物理、化学诱变可以单独使用,也可以联合使用。丛蕾蕾等^[14]以抗氧化剂没食子酸辛酯为筛选剂,经紫外-LiCl复合诱变高山被孢霉获得突变株R807,所得油脂中ARA含量为41.72%,比出发菌株提高了35.10%;唐鑫等^[15]通过ARTP诱变高山被孢霉获得ARA产量为1.55 g/L的突变株TSM-3-1,其ARA产量相比出发菌株提高了84.52%;Li等^[16]利用ARTP与DES结合对高山被孢霉进行诱变,得到的突变株ARA产量为5.09 g/L,比出发菌株提高了41.00%。综上,通过菌种选育获得遗传性状稳定且高产ARA的高山被孢菌株,对ARA工业化生产至关重要。

本研究以实验室保藏的高山被孢菌株FD-1为出发菌株,采用紫外-LiCl和ARTP进行多次诱变,利用氯化三苯基四氮唑(TTC)平板进行初筛,摇瓶发酵进行复筛,旨在获得高产ARA的高山被孢霉突变株,为促进ARA工业化发酵生产提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

高山被孢菌株FD-1,大连工业大学微生物发酵与代谢控制研究室保藏。

1.1.2 主要试剂

TTC、正庚烷,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、pH 7.2磷酸盐(PBS)缓冲液,天津大茂化学试剂厂;14%三氟化硼-甲醇,上海安谱实验科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

PDA培养基:去皮马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,自然pH,121℃灭菌20 min。玉米粉葡萄糖琼脂培养基(产孢培养基):玉米粉40 g/L,葡萄糖10 g/L,NaH₂PO₄ 1 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L,琼脂20 g/L,自然pH,121℃灭菌20 min。TTC培养基:去皮马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,TTC 0.5 g/L,自然pH,121℃灭菌20 min。种子培养基:葡萄糖30 g/L,酵母膏6 g/L,KH₂PO₄ 3 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,自然pH,121℃灭菌20 min。发酵培养基:葡萄糖80 g/L,可溶性淀粉15 g/L,黄豆粉10 g/L,酵母粉2 g/L,KH₂PO₄ 2 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L,pH 6.5,121℃灭菌20 min。

1.1.4 仪器与设备

UV8AC18HJ紫外诱变箱,北京赛百奥科技有限公司;ARTP-II诱变育种系统,思清源生物科技有限公司;7980A-5975C气相色谱-质谱联用仪,安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液制备

将甘油管保藏的菌株FD-1接种至产孢培养基斜面试管,28℃培养10 d,转移至4℃冰箱中,放置14 d用于产孢。取20 mL pH 7.2 PBS缓冲液洗下斜面上菌丝及孢子,转入瓶底铺满直径3~4 mm玻璃珠的250 mL锥形瓶中,200 r/min振荡30 min,于超净工作台用4层擦镜纸过滤,得孢子悬液^[16]。

1.2.2 紫外-LiCl复合诱变

将孢子悬液与1.5% LiCl溶液按体积比1:1混合,取10 mL混合液注入内含磁力搅拌子的无菌培养皿中,加盖并搅拌一段时间,使之混合均匀。在36 W紫外灯下距离25 cm照射,每隔一段时间取样100 μ L,涂布于PDA平板,25℃避光培养5 d。以未经诱变处理的孢子悬液涂布PDA平板作对照,统计平板上生长的单菌落数,以处理前后菌落数变化与处理前菌落数比值计算致死率。

1.2.3 TTC平板初筛

TTC溶于水时为无色溶液,被还原后生成红色的三苯基甲臜(TF),根据菌落颜色深浅,可以初步判定菌株细胞内脱饱和酶活性^[17]。菌体内脱饱和酶活性与ARA含量呈正相关,因此TTC平板上菌株颜色深浅程度与ARA产量呈正相关。将诱变处理的孢子悬液适度稀释后,涂布于TTC平板,25℃培养3 d,统计菌落数,观察平板上菌落颜色深浅,与未诱变菌株对应菌落的颜色进行对比,挑选红色较深的菌落作为初筛菌株,分别转接至PDA斜面,25℃培养5 d,于4℃冰箱保存。

1.2.4 摇瓶发酵复筛

向初筛菌株对应 PDA 斜面中加入 5 mL 无菌水,洗下菌丝和孢子,转入瓶底铺满玻璃珠的锥形瓶中振荡,打碎分散菌丝,得菌悬液。按 10% (以体积分数计算)的接种量将菌悬液接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 25 °C、150 r/min 条件下培养 72 h,得到种子液。以 10% (以体积分数计算)的接种量将种子液接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 25 °C、150 r/min 条件下培养 7 d,测定生物量、油脂产量、ARA 含量。

1.2.5 ARTP 诱变及突变菌株的初筛和复筛

以紫外 - LiCl 复合诱变筛选出的突变株为出发菌株,按 1.2.1 方法制成孢子悬液,取 20 μ L 孢子悬液均匀涂布在金属载片的上表面,无菌条件下将该载片放置在 ARTP 诱变系统的载物台上。以功率 100 W、距离 2 mm、气体流量 10 L/min 的诱变条件处理一段时间后,用无菌镊子将载片转移至装有 200 μ L PBS 缓冲液 (pH 7.2) 的 2 mL 离心管中,手动振荡 1 min。取 100 μ L 涂布于 PDA 平板,25 °C 培养 5 d。以未经 ARTP 处理的菌株孢子悬液涂布于 PDA 平板作对照,统计平板上生长的菌落数并计算致死率。对 ARTP 诱变后获得的突变株进行筛选,初筛方法同 1.2.3,复筛方法同 1.2.4。

1.2.6 生物量的测定

发酵液用四层纱布过滤,用蒸馏水冲洗至流出液无色,将菌体置于平皿中,60 °C 烘干,称质量,以每升发酵液中干菌体的质量计算生物量。

1.2.7 油脂含量和油脂产量的测定

将干菌体在研钵中充分研磨成均匀的干粉,准确称取 0.500 g 菌体干粉至滤纸包内,放入装有 150 mL 石油醚 (沸程 30 ~ 60 °C) 索氏提取器中,65 °C 下抽提 6 h,蒸干有机溶剂得菌体油脂,计算油脂含量,并以生物量与油脂含量的乘积计算油脂产量。

1.2.8 油脂脂肪酸组成及相对含量的测定

参照 GB 5009.168—2016,采用气相色谱 - 质谱联用法 (GC - MS) 测定菌体油脂脂肪酸组成及相对含量。

1.2.9 突变株的遗传稳定性测定

将经 ARTP 诱变筛选得到的突变株接种于 PDA 斜面,于 25 °C 培养 5 d,并进行 10 次斜面传代培养,按照 1.2.4 方法进行摇瓶发酵,测定传代菌株的生物量、油脂产量及 ARA 含量。

1.2.10 数据处理

采用 SPSS 26 软件对数据进行方差分析,Origin 2021 软件进行统计分析与作图, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 紫外 - LiCl 复合诱变

2.1.1 紫外 - LiCl 复合诱变紫外照射时间的确定

紫外线是非电离辐射的物理诱变,而 LiCl 是一种碱金属卤化物,单独使用没有诱变效果,常作为助诱变剂使用^[14]。按 1.2.2 方法进行菌株 FD - 1 的紫外 - LiCl 复合诱变,考察紫外照射时间对致死率的影响,结果见图 1。

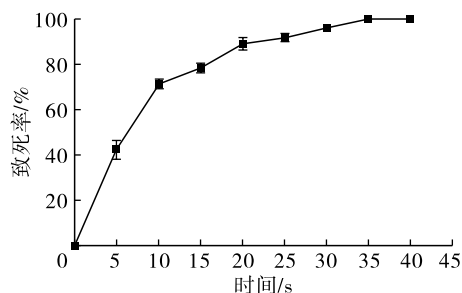


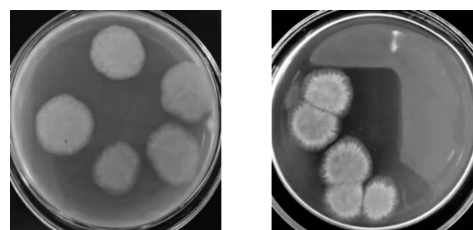
图 1 紫外照射时间对致死率的影响

Fig. 1 Effects of ultraviolet exposure time on the mortality

由图 1 可见,紫外线对高山被孢霉孢子有较强杀伤力,随着照射时间的延长,致死率增大。紫外照射 15 s 时致死率达 78.57%,紫外照射 30 s 时致死率达 96.43%,紫外照射 35 s 时致死率达 100%。现代育种理论认为,当微生物致死率在 70% ~ 80% 范围内,正突变率较高^[16],因此选择照射时间为 15 s。

2.1.2 高山被孢霉 FD - 1 的诱变和突变菌株的初筛

按 1.2.2 方法,采取紫外照射时间为 15 s 对菌株 FD - 1 进行紫外 - LiCl 复合诱变后,按 1.2.3 方法进行 TTC 初筛,筛选平板见图 2。



a) 出发菌株 FD-1 b) 紫外 - LiCl 复合诱变后菌株
a) Starting strain FD-1 b) Stain after UV - LiCl mutagenesis

图 2 紫外 - LiCl 复合诱变前后的 TTC 筛选平板

Fig. 2 TTC screening plates before and after UV - LiCl mutagenesis

由图 2 可以看出,出发菌株 FD - 1 在 TTC 平板上的菌落呈淡粉色,显色不明显。经紫外 - LiCl 复合诱变后,有些突变株的菌落呈粉色,与 FD - 1 菌落相比呈色加深。紫外 - LiCl 复合诱变后经 TTC 平板筛选共得到 114 个菌落,其中颜色深于 FD - 1 的菌落共 34 个,其菌株标记为 Z1 ~ Z34。紫外 - LiCl 复合诱变初筛结果如表 1 所示。

表 1 紫外 - LiCl 复合诱变初筛结果

Table 1 Preliminary screening results of UV - LiCl mutagenesis

菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果
FD - 1		Z7	+	Z14	+	Z21	+	Z28	++
Z1	+	Z8	++	Z15	+	Z22	+	Z29	+
Z2	+	Z9	++	Z16	+	Z23	+	Z30	+
Z3	+	Z10	+	Z17	+	Z24	+	Z31	+
Z4	+	Z11	++	Z18	+	Z25	++	Z32	+
Z5	+	Z12	+	Z19	++	Z26	+	Z33	+
Z6	++	Z13	+	Z20	+	Z27	+	Z34	+

注：“+”表示菌落颜色深于 FD - 1；“++”表示菌落颜色深于“+”

Note: "+" indicates that the colony is darker than FD - 1; "++" means the colony is darker than "+"

表 2 紫外 - LiCl 复合诱变得到的突变株摇瓶发酵结果

Table 2 Fermentation results of mutants by UV - LiCl mutagenesis in shaking flask

菌株	生物量/(g/L)	油脂产量/(g/L)	油脂含量/%	ARA 含量/%	ARA 产量/(g/L)
FD - 1	21.59 ± 1.85	4.39 ± 0.51	20.30 ± 0.88	25.41 ± 0.64	1.12 ± 0.15
Z6	27.41 ± 1.51	8.01 ± 0.28	29.24 ± 0.83	30.60 ± 0.74	2.45 ± 0.23
Z8	23.21 ± 0.54	6.27 ± 0.34	27.03 ± 0.52	30.23 ± 0.82	1.90 ± 0.65
Z9	25.70 ± 1.31	6.81 ± 0.12	26.48 ± 0.42	30.59 ± 0.23	2.08 ± 0.58
Z11	27.51 ± 0.38	5.81 ± 0.41	21.34 ± 0.92	31.02 ± 0.43	1.75 ± 0.23
Z19	25.16 ± 1.24	7.19 ± 0.11	28.56 ± 0.78	30.26 ± 0.44	2.17 ± 0.36
Z25	27.53 ± 0.81	5.86 ± 0.64	22.09 ± 0.66	30.74 ± 0.52	1.80 ± 0.80
Z28	22.25 ± 1.49	4.87 ± 0.55	21.86 ± 2.06	29.60 ± 0.46	1.44 ± 0.14

2.2 ARTP 诱变

2.2.1 ARTP 诱变时间的确定

为获得更优良的 ARA 高产突变株,将紫外 - LiCl 复合诱变得到的 Z6 再进行 ARTP 诱变。按照 1.2.5 方法对突变株 Z6 进行 ARTP 诱变,考察诱变时间对致死率的影响,结果见图 3。

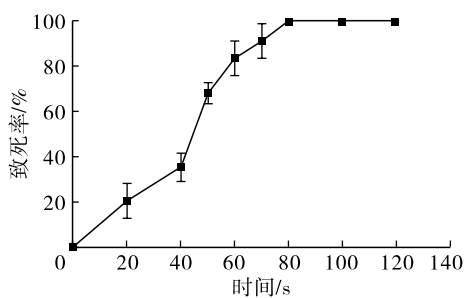


图 3 ARTP 诱变时间对致死率的影响

Fig. 3 Effects of ARTP mutagenesis time on the mortality

由图 3 可以看出,随着 ARTP 诱变时间的延长,致死率增加,ARTP 诱变时间为 40 s 时致死率为 35.36%,ARTP 诱变时间为 70 s 时致死率为 91.07%,ARTP 诱变时间超过 80 s 后致死率则达 100%。据文献报道^[17],ARTP 诱变致死率为 90% ~ 95%

从表 1 可以看出,颜色深于 FD - 1 菌落的 34 个突变株中,Z6、Z8、Z9、Z11、Z19、Z25 和 Z28 颜色最深。

2.1.3 摇瓶发酵复筛

按 1.2.4 方法对初筛得到的 7 个突变株进行摇瓶发酵,结果如表 2 所示。

由表 2 可看出,与 FD - 1 相比,7 个突变株在生物量、油脂产量、ARA 含量、ARA 产量方面均有不同程度的提高,其中以突变株 Z6 综合表现最佳,其生物量为 27.41 g/L,油脂产量为 8.01 g/L,油脂含量为 29.24%,ARA 含量达 30.60%,ARA 产量为 2.45 g/L。

时,正突变率最高,因此选择 ARTP 诱变时间为 70 s。

2.2.2 ARTP 诱变 Z6 突变菌株的初筛

对 Z6 进行 70 s 的 ARTP 诱变处理后,按 1.2.3 方法进行 TTC 平板初筛,ARTP 诱变前后的 TTC 筛选平板结果见图 4。

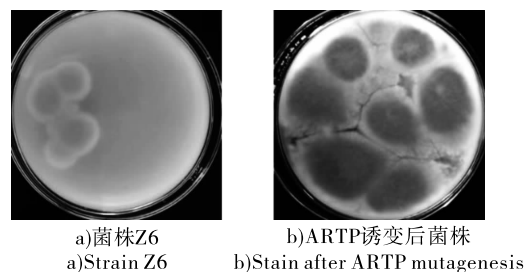


图 4 ARTP 诱变前后的 TTC 筛选平板

Fig. 4 TTC screening plates before and after ARTP mutagenesis

从图 4 可以看出,Z6 菌落呈粉色,ARTP 诱变后的某些突变株菌落呈红色,颜色更深。

经 ARTP 诱变后共得到 180 个菌落,其中颜色深于菌株 Z6 的菌落共 44 个,其菌株标记为 Z6 - A1 ~ Z6 - A44,ARTP 诱变初筛结果见表 3。

表3 ARTP 诱变初筛结果

Table 3 Preliminary screening results of ARTP mutagenesis

菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果	菌株	结果
Z6	++	Z6-A9	+++	Z6-A18	+++	Z6-A27	+++	Z6-A36	+++
Z6-A1	+++	Z6-A10	++++	Z6-A19	++++	Z6-A28	+++	Z6-A37	+++
Z6-A2	+++	Z6-A11	++++	Z6-A20	+++	Z6-A29	+++	Z6-A38	+++
Z6-A3	+++	Z6-A12	+++	Z6-A21	++++	Z6-A30	+++	Z6-A39	+++
Z6-A4	+++	Z6-A13	++++	Z6-A22	+++	Z6-A31	++++	Z6-A40	+++
Z6-A5	+++	Z6-A14	+++	Z6-A23	++++	Z6-A32	+++	Z6-A41	+++
Z6-A6	+++	Z6-A15	+++	Z6-A24	+++	Z6-A33	+++	Z6-A42	+++
Z6-A7	++++	Z6-A16	+++	Z6-A25	+++	Z6-A34	+++	Z6-A43	+++
Z6-A8	+++	Z6-A17	+++	Z6-A26	+++	Z6-A35	+++	Z6-A44	+++

注：“+++”表示菌落颜色深于Z6；“++++”表示菌落颜色深于“+++”

Note: "+++" indicates that the colony is darker than Z6; "++++" indicates that the colony is darker than "+++"

由表3可知,菌落颜色深于突变株Z6的44株菌中,Z6-A7、Z6-A10、Z6-A11、Z6-A13、Z6-A19、Z6-A21、Z6-A23和Z6-A31颜色最深。

2.2.3 摇瓶发酵复筛

按1.2.4方法对2.2.2得到的8株突变株进行摇瓶发酵,结果如表4所示。

表4 ARTP 诱变得到的突变株摇瓶发酵结果

Table 4 Fermentation results of mutants by ARTP mutagenesis in shaking flask

菌株	生物量/(g/L)	油脂产量/(g/L)	油脂含量/%	ARA 含量/%	ARA 产量/(g/L)
Z6	27.41 ± 1.51	8.01 ± 0.28	29.24 ± 0.83	30.60 ± 0.74	2.45 ± 0.23
Z6-A7	23.85 ± 2.22	8.60 ± 1.33	36.48 ± 8.97	31.17 ± 1.00	2.67 ± 0.33
Z6-A10	25.67 ± 3.38	8.35 ± 0.52	32.68 ± 2.26	36.48 ± 1.55	2.64 ± 0.63
Z6-A11	21.14 ± 2.52	6.80 ± 1.22	32.74 ± 9.65	36.32 ± 0.04	2.47 ± 0.44
Z6-A13	29.05 ± 2.53	9.82 ± 0.53	33.90 ± 2.19	38.07 ± 1.26	3.73 ± 0.11
Z6-A19	21.21 ± 1.74	4.73 ± 1.63	22.06 ± 5.86	35.91 ± 1.91	1.68 ± 0.49
Z6-A21	21.33 ± 1.97	8.18 ± 0.79	38.39 ± 2.43	38.15 ± 0.84	3.12 ± 0.29
Z6-A23	26.10 ± 1.15	8.14 ± 0.61	31.19 ± 2.05	44.57 ± 0.71	3.62 ± 0.23
Z6-A31	31.82 ± 2.01	7.28 ± 0.51	22.87 ± 0.16	32.78 ± 0.10	2.39 ± 0.17

由表4可看出,与突变株Z6相比,8株突变株ARA含量均有一定幅度的提高,尤其是突变株Z6-A23,其所产油脂中ARA含量高达44.57%,ARA产量达到3.62 g/L,分别较突变株Z6提高了45.65%和47.76%,较出发菌株FD-1提高了75.40%和223.21%。ARA含量是反映高山被孢霉生物合成ARA能力的重要指标。突变株Z6-A23所产油脂中ARA含量最高,表现出高产ARA的应用潜力。

2.3 菌株FD-1、Z6-A23的脂肪酸组成

利用GC-MS对出发菌株FD-1和突变株Z6-A23所产油脂的脂肪酸组成进行分析,结果见图5。

由图5可以看出,突变株Z6-A23与出发菌株FD-1的脂肪酸组成相同,但各脂肪酸含量差异明显。相比于出发菌株FD-1,突变株Z6-A23的C16、C18系列脂肪酸含量较低,而C20、C22、C24系列脂肪酸含量较高,说明突变株Z6-A23合成超长链脂肪酸的能力更强。突变株Z6-A23的ARA含

量远高于出发菌株FD-1,说明该突变株具有高产ARA的潜力。

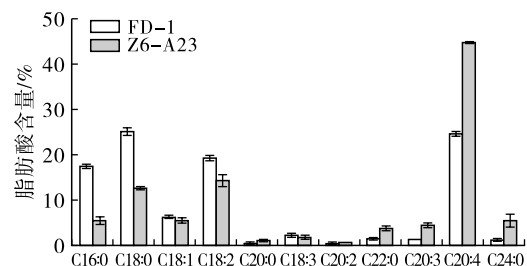


图5 菌株FD-1和Z6-A23所产油脂的脂肪酸组成及相对含量

Fig. 5 Fatty acids composition and relative contents of oil produced by strain FD-1 and Z6-A23

2.4 突变株Z6-A23的遗传稳定性

对突变株Z6-A23进行10次传代培养,传代菌株(ZA23-1~ZA23-10)的生物量、油脂产量及ARA含量见表5。

表 5 突变株 Z6 - A23 传代菌株的生物量、油脂产量及 ARA 含量

Table 5 Biomass, oil yield and ARA content of mutant Z6 - A23 after 10 generations

传代菌株	生物量/(g/L)	油脂产量/(g/L)	油脂含量/%	ARA 含量/%	ARA 产量/(g/L)
ZA23 - 1	26.10 ± 1.15	8.14 ± 0.61	31.19 ± 2.05	44.57 ± 0.71	3.62 ± 0.23
ZA23 - 2	27.10 ± 1.78	7.66 ± 0.53	28.27 ± 0.99	44.63 ± 1.12	3.42 ± 0.18
ZA23 - 3	27.44 ± 2.60	8.44 ± 0.37	30.83 ± 1.58	43.88 ± 0.71	3.70 ± 0.10
ZA23 - 4	26.38 ± 2.46	8.82 ± 0.26	33.43 ± 2.64	43.95 ± 1.90	3.88 ± 0.21
ZA23 - 5	25.59 ± 1.10	8.67 ± 0.20	33.88 ± 0.77	43.49 ± 0.96	4.21 ± 0.16
ZA23 - 6	26.20 ± 1.24	7.50 ± 0.64	28.61 ± 0.01	44.08 ± 0.18	3.31 ± 0.27
ZA23 - 7	24.75 ± 2.42	9.70 ± 0.17	39.38 ± 2.98	44.49 ± 1.03	4.32 ± 0.18
ZA23 - 8	22.25 ± 0.83	9.67 ± 0.20	43.49 ± 1.17	44.25 ± 1.02	4.28 ± 0.05
ZA23 - 9	26.89 ± 1.42	8.09 ± 0.30	32.53 ± 4.29	44.85 ± 0.78	3.63 ± 0.16
ZA23 - 10	26.91 ± 1.70	8.84 ± 1.76	32.85 ± 3.08	45.17 ± 0.18	3.99 ± 0.80
平均值	25.96	8.55	33.45	44.34	3.84

由表 5 可以看出,突变株 Z6 - A23 在传代过程中,各代菌株油脂中 ARA 含量较为稳定,保持在 43.49% ~ 45.17% 范围内,说明突变株 Z6 - A23 在高效生物合成 ARA 方面具有较好的遗传稳定性。经 10 次传代培养,平均生物量为 25.96 g/L,平均油脂产量为 8.55 g/L,平均 ARA 含量为 44.34%,平均 ARA 产量达 3.84 g/L。

3 结 论

采用紫外 - LiCl 联合 ARTP 对高山被孢霉菌株 FD - 1 进行诱变处理,结合 TTC 平板初筛,摇瓶发酵复筛,获得一株传代遗传稳定性良好的 ARA 高产突变株 Z6 - A23。高山被孢霉突变株 Z6 - A23 所产油脂中 ARA 含量高达 44.57%,ARA 产量达到 3.62 g/L,分别较出发菌株 FD - 1 提高了 75.40% 和 223.21%。突变株 Z6 - A23 经 10 次传代培养,其生物合成 ARA 的遗传性能稳定。本研究为高山被孢霉工业化生产 ARA 油脂提供了优良的潜力菌株。

参考文献:

[1] GORICA E, CALDERONE V. Arachidonic acid derivatives and neuroinflammation [J]. *CNS Neurol Disord - Dr*, 2022, 21(2): 118 - 129.

[2] CONWAY M C, MCSORLEY E M, MULHERN M S, et al. Influence of fatty acid desaturase (FADS) genotype on maternal and child polyunsaturated fatty acids (PUFA) status and child health outcomes: A systematic review[J]. *Nutr Rev*, 2020, 78(8): 627 - 646.

[3] LI Y W, GUO Q, PENG Q Q, et al. Recent development of advanced biotechnology in the oleaginous fungi for arachidonic acid production[J]. *ACS Synth Biol*, 2022, 11(10): 3163 - 3173.

[4] CHANG L, LU H, CHEN H, et al. Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: Current

progress and future prospects [J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2022, 54: 107794[2024 - 01 - 16]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107794>.

- [5] OLIVER L, DIETRICH T, MARAÑÓN I, et al. Producing omega - 3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market [J/OL]. *Resources*, 2020, 9(12): 148 [2024 - 01 - 16]. <https://doi.org/10.3390/resources9120148>.
- [6] CHANG L, CHEN H, TANG X, et al. Advances in improving the biotechnological application of oleaginous fungus *Mortierella alpina* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(16): 6275 - 6289.
- [7] 周正雄, 卢英华, 班甲, 等. 微生物发酵法生产花生四烯酸油脂的研究进展 [J]. *生物加工过程*, 2013, 11(4): 72 - 78.
- [8] GOYZUETA - MAMANI L D, DE CARVALHO J C, MAGALHÃES A I J, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* using wastes from potato chips industry [J]. *J Appl Microbiol*, 2021, 130(5): 1592 - 1601.
- [9] 杨勇, 王中江, 毕爽, 等. 深黄被孢霉突变菌株发酵制备花生四烯酸工艺研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47(1): 45 - 50.
- [10] 戴群, 戴传超, 顾敏. 花生四烯酸高产菌株的诱变和筛选研究 [J]. *食品科技*, 2010, 35(1): 19 - 22, 26.
- [11] ZHANG H, CUI Q, SONG X. Research advances on arachidonic acid production by fermentation and genetic modification of *Mortierella alpina* [J/OL]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(1): 4 [2024 - 01 - 16]. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02984-2>.
- [12] MAMANI L D G, MAGALHÃES A I J, RUAN Z, et al. Industrial production, patent landscape, and market trends of arachidonic acid - rich oil of *Mortierella alpina* [J]. *Biotechnol Res Innov*, 2019, 3(1): 103 - 119.

(下转第 110 页)

- 381; 132158 [2023 - 10 - 09]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132158>.
- [52] PANYOYAI N, SILSIN M, KHONGDAN J, et al. Effect of partial replacement of soybean with chickpea to the nutritional and textural properties of tofu [J]. *Indones Food Sci Technol J*, 2021, 4(2): 27 - 31.
- [53] 高佳嘉, 李艾潼, 张彩霞, 等. 发酵豆制品加工方法与营养功能的对比分析[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(8): 156 - 161.
- [54] SUI X. Structural analysis and texture study of plant - based (meat) products [J]. *J Texture Stud*, 2023, 54(3): 349 - 350.
- [55] 黄留敏. 热损大豆的油脂成分分析及其中四种色素的稳定性及吸附脱除效果的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2022.
- [56] 寇含笑. 高油大豆储藏期间的品质变化研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- [57] IDARYANI, RAUF A W, FATTAH A, et al. Effect of harvest time on soybean seed quality of detap - 1 variety [J/OL]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2021, 828(1): 12027 [2023 - 10 - 09]. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/828/1/012027>.
- [58] ZUFFO A M, ZUFFO J M J, CARVALHO E R, et al. Physiological and enzymatic changes in soybean seeds submitted to harvest delay [J]. *Pesqui Agropecu Trop*, 2017, 47(4): 488 - 496.
- [59] 郑祖庭. 2022 年国内外大豆市场回顾及 2023 年展望 [J]. *黑龙江粮食*, 2023(3): 27 - 30.
- [60] 许仁杰. 浅圆仓进口大豆安全储藏管理技术[J]. *粮食科技与经济*, 2022, 47(2): 73 - 75, 116.
- [61] 陈萍, 何洪洲, 单振菊, 等. 进口大豆储运温度和含水量对大豆发生热损伤的影响[J]. *中国油脂*, 2015, 40(10): 31 - 35.
- [62] NEVE J M G, OLIVEIRA J A, DA SILVA H P, et al. Quality of soybean seeds with high mechanical damage index after processing and storage [J]. *Rev Bras Eng Agric Ambient*, 2016, 20(11): 1025 - 1030.
- [63] ZIEGLER V, FERREIRA C D, HOFFMANN J F, et al. Effects of moisture and temperature during grain storage on the functional properties and isoflavone profile of soy protein concentrate [J]. *Food Chem*, 2018, 242: 37 - 44.
- [64] POHNDORF R S, MENEGHETTI V L, PAIVA F F, et al. Kinetic evaluation of oxidative stability and physical degradation of soybean grains stored at different conditions [J/OL]. *J Food Process Preserv*, 2018, 42(10): 13717 [2023 - 10 - 09]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13717>.
- [65] CZAİKOSKI K, CARRAO - PANIZZI M C, DA SILVA J B, et al. Effects of storage time and temperature on the characteristics of vegetable - type soybean grain minimally processed [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2012, 55(4): 491 - 496.
- [66] 武传欣, 武传森, 程小丽. 氮气气调储粮应用研究 [J]. *粮食加工*, 2013, 38(5): 64 - 67.
- [67] CORADI P C, LIMA R E, PADIA C L, et al. Soybean seed storage: Packaging technologies and conditions of storage environments [J/OL]. *J Stored Prod Res*, 2020, 89: 101709 [2023 - 10 - 09]. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101709>.
- [68] LUDWIG V, BERGHETTI M R P, RIBEIRO S R, et al. The effects of soybean storage under controlled atmosphere at different temperatures on lipid oxidation and volatile compounds profile [J/OL]. *Food Res Int*, 2021, 147: 110483 [2023 - 10 - 09]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110483>.
-
- (上接第 87 页)
- [13] DIAO J, SONG X, GUO T, et al. Cellular engineering strategies toward sustainable *omega* - 3 long chain polyunsaturated fatty acids production: State of the art and perspectives [J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2020, 40: 107497 [2024 - 01 - 16]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107497>.
- [14] 丛蕾蕾, 纪晓俊, 聂志奎, 等. 花生四烯酸油脂高产菌株的选育 [J]. *生物加工过程*, 2012, 10(5): 34 - 38.
- [15] 唐鑫, 陈海琴, 姚青蔚, 等. 高产花生四烯酸高山被孢霉的诱变育种研究 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(8): 104 - 108.
- [16] LI X, LIU R, LI J, et al. Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatments [J]. *Bioresour Technol*, 2015, 177: 134 - 140.
- [17] ZHU M, YU L J, LIU Z, et al. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(4): 332 - 335.